

玉米大斑病菌 Ht- 毒素的萃取及其致病活性

董金泉 史有艳 康绍兰 黄梧芳

(河北农业大学植物保护系, 保定 071001)

摘要 采用体外 (in vitro) 固体和液体培养玉米大斑病菌——大斑病长蠕孢 (*Helminthosporium turcicum*), 培养物经有机溶剂萃取后减压蒸发获得了 Ht- 粗毒素, 最后用种子根伸长抑制, 离体根冠细胞死亡和离体叶片致萎等生物测定法, 对玉米大斑病菌的体外代谢产物进行了致病活性和毒性测定, 筛选出乙腈等有机溶剂, 可以用于 Ht- 毒素的萃取, 为 Ht- 毒素的进一步提纯和结构分析奠定了基础。

关键词 玉米; 大斑病长蠕孢 (*Helminthosporium turcicum*); 真菌毒素; 毒素萃取; 生物测定

玉米大斑病是一种危害严重的玉米叶斑病, 国内外的研究提出, 由于大斑病长蠕孢 (*Helminthosporium turcicum*) 能产生对玉米致病的毒素 (Ht- 毒素), 促使玉米叶片迅速萎蔫死亡, 俗称“跑马干”, 从而严重地威胁着玉米的产量。实践证明, 利用玉米带 Ht 基因的抗病品种是防治该病害最经济有效的途径。为加速抗病育种进程和保持品种抗性的长期稳定性, 河北农业大学自 80 年代末期即着手研究毒素致

病和利用细胞工程技术快速培育抗病新品种的工作。本文主要报道有关玉米大斑病菌的代谢产物——Ht- 毒素萃取和纯化的初步结果, 为进一步探讨抗病和致病机理奠定基础。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 供试玉米: 为掖单 4 号杂交种。
2. 供试菌种: 大斑病长蠕孢 (*Helminthos-*

porium turcicum)248 号单孢菌系(经测试为 1 号生理小种)。

3. 供试有机溶剂:均为分析一级(杂质含量不超过 1%),由天津化学试剂厂生产。

以上均由河北农业大学植物免疫学研究室提供。

(二) 方法

1. Ht- 毒素的制备:采用体外(in vitro)液体培养[培养基为改良 Fries 培养液(g):蔗糖 30, 酒石酸铵 5, NH_4NO_3 1, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 酵母浸出汁 0.5, NaCl 0.1, CaCl_2 0.1, 蒸馏水 1000ml, 调 pH 4.0]和固体培养(基质为高粱粒)二种方式。(1)液体培养方法:在含有 200ml 改良 Fries 液的锥形瓶中,定量接种玉米大斑病菌菌丝块($\phi=8\text{mm}$)4 块,置 25—28℃ 黑暗条件下静止培养 20 天,然后用二层纱布过滤除去菌丝块获得含 Ht- 毒素的培养物滤液,滤液加热浓缩成原体积的 1/5 待萃取;(2)固体培养方法:称取 50g 高粱粒并连同 25ml 蒸馏水倒入锥形瓶内,灭菌后接 4 块菌丝块,培养条件同液体培养,30 天后用于萃取。

2. Ht- 毒素的有机物萃取:液体培养,培养滤液加入等体积有机溶剂(单一或混合)后置磁力搅拌器上充分搅拌均匀,收集连续三次萃取溶于有机溶剂部分,在 70—80℃ 恒温水浴下减压蒸发;固体培养,在接种 30 天后加入有机溶剂萃取 48 小时,然后过滤,减压蒸发,即获得 Ht- 粗毒素。

3. Ht- 毒素的致病活性和毒性测定方法:

(1) 种子根伸长抑制法:采用 Lim 等人提出又经康绍兰等人改进的“萌发包”法^[2,6],此法用于 Ht- 毒素的半定量毒性测定。

(2) 根冠细胞死亡测定法:采用 Hawes 等人提出又经董金皋等人改进的改良根冠细胞测定法^[1,3,4],此法用于 Ht- 毒素的定量毒性测定。

(3) 离体叶片致萎测定法:取 4—5 叶期的玉米叶片,剪成 20×10mm 的小块,平放在已用 Ht- 毒素浸湿的滤纸上,置光暗交替(12h/d, 光照度 6500lx)下培养,定时观察叶片的病变情

况。此法用于 Ht- 毒素致病活性的定性测定。

结果与分析

(一) 玉米大斑病菌固体培养物的 Ht- 毒素萃取及生物测定

1. Ht- 毒素萃取后的外观形态:玉米大斑病菌固体培养物用乙酸乙酯、氯仿、石油醚、乙腈、乙醇等有机溶剂萃取过滤的结果:(1)乙酸乙酯、氯仿萃取后的溶液分为上、下二层,而石油醚、乙醇、乙腈等只有一层;(2)萃取后溶液的颜色由淡黄→黑褐色的程度也因采用不同的溶剂而异:石油醚<氯仿,乙醚<甲醇、甲醛,水<乙醇、乙酸乙酯<乙腈、正丁醇<丙酮;(3)萃取后溶液的清晰度也有差异:乙腈、乙醇和丙酮等极性较强的溶剂有沉淀出现,甲醛和水萃取的溶液比较混浊,石油醚,乙酸乙酯等其他溶剂萃取的溶液为均一的溶液;(4)萃取后的溶液经减压、蒸发,即蒸去有机溶剂后便获得棕褐色粘稠状的 Ht- 粗毒素,这些来自于不同有机溶剂萃取,蒸发后的粗毒素的溶解性也有差别:其中用甲醛、甲醇、乙腈、乙醇、丙酮和水萃取的粗毒素可溶于水,乙酸乙酯、氯仿等则在加热条件才微溶于水。

2. 单一有机溶剂萃取结果:从玉米大斑病菌固体培养的代谢产物经有机溶剂萃取后的结果(表 1)可以看出:(1)各有机溶剂提取物之间产生的 Ht 粗毒素的量差异很大,最高达 201.08g/kg 如甲醛提取物,最低为 0.64g/kg 如石油醚提取物,一般在 16—30g/kg。(2)各有机溶剂提取物的致病活性,从生物测定结果发现,在粗毒素浓度为 50mg/ml 时,乙腈、石油醚、乙酸乙酯、甲醇和乙醚的提取物在测定的第 5 天即可诱导叶片产生典型的条状坏死病斑,到第 9 天病变面积已达 1/2 以上,尤其是乙腈和石油醚的提取物在第 9 天已使整叶变褐枯死;对照用水的提取物,第 9 天时也使叶片出现典型症状;其他有机溶剂提取物(如正丁醇,乙醇,丙酮等)虽然具有一定的毒性,也可诱致叶片出现不同类型的病变,但症状不典型,故可视为无致病活性。

表 1 玉米大斑病菌固体培养物萃取后 Ht- 粗毒素的产生量及活性

有机溶剂	毒素产生量 ^a (g/kg)	生物测定 ^b		
		症状特点	症状变化	
			5d	9d
乙腈	28.21	条状坏死斑	++	+++
石油醚	0.64	条状坏死斑	++	+++
乙酸乙酯	16.37	条状坏死斑, 叶断面水渍状	++	+++
甲醇	4.89	条状坏死斑	++	+++
乙醚	20.95	条状坏死斑, 叶断面水渍状	+	+++
水 (CK)	29.37	条状坏死斑	0	+
氯仿	18.19	整叶黄化, 叶脉绿色, 叶断面水渍状	+++	+++
正丁醇	21.91	轻微失绿	0	+
甲醛	201.08	叶断面水渍状	0	++
乙醇	28.09	叶断面水渍状	0	+
丙酮	22.07	叶断面变褐坏死	0	+

a: 数据为每公斤固体基质提取 Ht- 粗毒素的克数
b: “+” 示病变叶面积占整叶面积的 <1/4, “++” 占 1/2-1/4, “+++” 占 >1/2, “0” 示正常叶
生物测定所用 Ht- 粗毒素浓度为 50mg/ml

3. 混合有机溶剂萃取结果: 两种有机溶剂混合萃取玉米大斑病菌固体培养物 (表 2), 结果发现, 正丁醇: 丙酮和乙腈: 石油醚 (体积比为 1:1) 两组混合溶剂萃取产生 Ht- 粗毒素的量分别为 35.49 和 21.96g/kg, 经离体叶片浸渍致萎

生物测定具有很强的致病活性, 在第 9 天前组已诱使整叶变褐枯死, 后组病变面积已达 1/2 以上; 另外氯仿和丙酮混合溶剂的提取物在第 9 天也可诱致叶片出现典型的症状。而其他混合有机溶剂的处理不能诱致叶片出现条状坏死斑。

表 2 有机溶剂混合萃取后产生 Ht- 粗毒素的量及活性

有机溶剂	毒素产生量 ^a (g/kg)	生物测定 ^b		
		症状特点	症状变化	
			5d	9d
正丁醇 + 丙酮	35.49	条状坏死斑	+++	+++
石油醚 + 乙腈	21.96	条状坏死斑, 叶断面水渍状 *	++	+++
氯仿 + 丙酮	25.50	条状坏死斑	0	+++
石油醚 + 丙酮	22.03	叶断面处变褐坏死	0	+
氯仿 + 乙腈	28.60	叶片黄化, 叶脉绿色, 叶断面水渍状	+	+++

a: 数据为每公斤固体基质提取 Ht- 粗毒素的克数
b: “+” 示病变叶面积占整叶面积的 <1/4, “++” 占 1/2-1/4, “+++” >1/2, “0” 示正常叶
生物测定所用 Ht- 粗毒素浓度为 50mg/ml

表 1 和表 2 的结果表明: 如果用正丁醇和丙酮单独萃取, 提取物均无致病活性, 等体积混合后再用于萃取时, 提取物不仅产生 Ht- 粗毒素的量很大, 而且致病活性也很强, 推测 Ht- 粗毒素至少具二个功能基团; 氯仿和丙酮也有类似现象。

4. Ht- 毒素生物测定: 对具有致病活性的提取物进行种子根伸长抑制和离体根冠细胞致死生物测定, 结果表明, 乙腈、乙酸乙酯和正丁醇 + 丙酮等提取物对玉米种子根和离体根冠细胞均有很强的抑制和致死作用; 甲醇、乙醚和水的提取物毒性中等; 石油醚提取物虽对种子根抑制作用很强, 但对根冠细胞的致死作用却很弱; 此外, 石油醚 + 乙腈及氯仿 + 丙酮的提取物毒性对根冠细胞有一定的致死作用, 但却促进根的伸长 (表 3)。

表 3 不同提取物 Ht- 粗毒素的毒性测定

有机溶剂	种子根伸长生物测定 ^a		根冠细胞致死生物测定 ^b	
	种子根长度 (mm)	抑制率 (%)	存活数 (%)	致病率 (%)
乙腈	14.05	24.58	65.1	32.05
石油醚	13.82	25.82	93.9	1.98
正丁醇 + 丙酮	14.26	23.48	78.8	17.75
乙酸乙酯	12.78	31.40	73.0	23.80
甲醇	16.88	9.39	82.2	14.20
石油醚 + 乙腈	20.13		88.5	7.62
乙醚	16.35	12.24	88.0	8.14
氯仿 + 丙酮	19.94		86.2	10.02
水 (CK ₁)	14.73	20.93	85.7	10.33

a. 毒素浓度 (10mg/ml), 水浸泡根 (CK₂) 根长 18.63mm

b. 毒素浓度 (1mg/ml), 水直接处理 (CK₂) 根冠细胞存活数为 95.8%

(二) 玉米大斑病菌液体培养物的 Ht-毒素的萃取及生物测定

表 4 结果表明, 玉米大斑病菌经活体外液体培养 20 天后用不同的有机溶剂的萃取, 发现如乙腈、丙酮和乙醇有沉淀物产生, 这些沉淀物经叶片浸渍和根冠细胞致死生物测定均具有较强的生物活性, 丙酮沉淀物以 1mg/ml 的浓度可诱

致细胞 15% 以上死亡, 叶片 1/2 以上面积变褐枯死, 说明丙酮沉淀物中含有 Ht-毒素成份; 而石油醚和乙酸乙酯虽提取物的致病活性稍弱, 但因用于液体提取可以分层且不出现沉淀, 故认为较好; 直接浓缩的滤液致病活性很强, 但因无法消除其他杂质的干扰, 故测定结果不太精确。

表 4 玉米大斑病菌液体培养物萃取后产生 Ht- 粗毒素的量及活性

提取物	毒素产生量 (g/L)	叶片浸渍致萎 病变面积	诱致根冠细胞 致死率 (%)
乙腈 沉淀物	6.7334	++	4.87
乙腈 提取物	29.8912	+++	13.59
乙醇 沉淀物	6.2264	++	6.90
乙醇 提取物	27.6816	++	4.66
丙酮 沉淀物	14.8260	+++	15.62
丙酮 提取物	0.7766	0	0.81
乙酸乙酯提取物	8.2316	+	3.65
石油醚提取物	14.6746	++	3.65
乙醚提取物	4.9004	+	4.87
滤液浓缩物	31.1762	+++	7.30

“+”示病变叶面积占整叶面积的 <1/4, “++”占 1/2 — 1/4, “+++”占 >1/2, “0”示正常叶
生物测定所用 Ht-粗毒素浓度为 50mg/ml

讨 论

玉米大斑病菌 Ht- 毒素的分离和提纯是国内外研究的空白, 本文对玉米大斑病菌体外固体和液体培养并经有机溶剂萃取, 结果表明, Ht- 毒素易溶于乙腈、石油醚、乙酸乙酯、甲

醇、乙醚和水等中, 用上述溶剂萃取玉米大斑病菌的培养物其致病活性成份不会丧失 (表 1), 而且固体培养的以乙腈萃取为佳, 其次是乙酸乙酯和石油醚, 水提取也有一定的致病活性, 但作用较弱, 且蒸发也不迅速, 不甚理想; 液体培养的以石油醚和乙酸乙酯较好, 其他象乙醇, 乙腈

和丙酮因不分层无法消除杂质,而且因毒性成份常伴随沉淀而丢失(表 4),象乙醚提取物经离体叶片浸渍测定不出现典型症状,因此不可用于 Ht-毒素的萃取。

试验结果表明,不能用于 Ht-毒素萃取的单一有机溶剂,但是两种混合后再用于萃取,提取物表现了致病活性(如正丁醇和丙酮的混合萃取),说明 Ht-毒素成份很复杂,初步推测至少有二个功能基团,对所有具致病活性的 Ht-粗毒素用种子根伸长抑制和根冠细胞死亡生物测定法进行了毒性测定,发现二种生测方法结果具一定的相关性。总的看来乙腈单独萃取或正

丁醇和丙酮混合萃取效果较为理想,更深入的研究还在进行中。

参 考 文 献

1. 董金皋, 黄梧芳: 河北农业大学学报, 11(1):66 — 74, 1988。
2. 董金皋, 黄梧芳: 植物病理学报, 18(4):239 — 244, 1988。
3. 董金皋等, 生物学杂志, 40(2):22 — 24, 1992。
4. 董金皋等, 植物保护, 18(5):38 — 40, 1992。
5. Hawes M C; Wheeler H: *Physiol. Pl. Pathol.*, 20: 137 — 144, 1982。
6. Lim S M et al.: *Agronomy Journal*, 63:712 — 713, 1971。
7. Payne G A et al.: *Physiol. Pl. Pathol.*, 16:227 — 239, 1980。

(1992-1-7 收稿)

EXTRACTION OF HT-TOXIN PRODUCED BY *HELMINTHOSPORIUM TURCICUM* AND ITS PATHOGENIC ACTIVITY

Dong Jingao Shi Youyan, Kang Shaolan Huang Wufang

(Department of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001)

Ht-toxin was extracted by singular or mixed organic solvents after solid and liquid culturing *Helminthosporium turcicum* in vitro, and pathogenic activity and toxicity of these extracts were assayed using root growth inhibition, isolated root cap cell death and isolated leaf soaking bioassays. Several best singular and mixed organic solvents have been screened for extracting Ht-toxin in vitro and this may lay foundation for its purification and structure analysis.

Key words *Helminthosporium turcicum*; Mycotoxin; Bioassay; Extraction of Ht-toxin; Maize